

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 24 日 (24.07.2003)

PCT

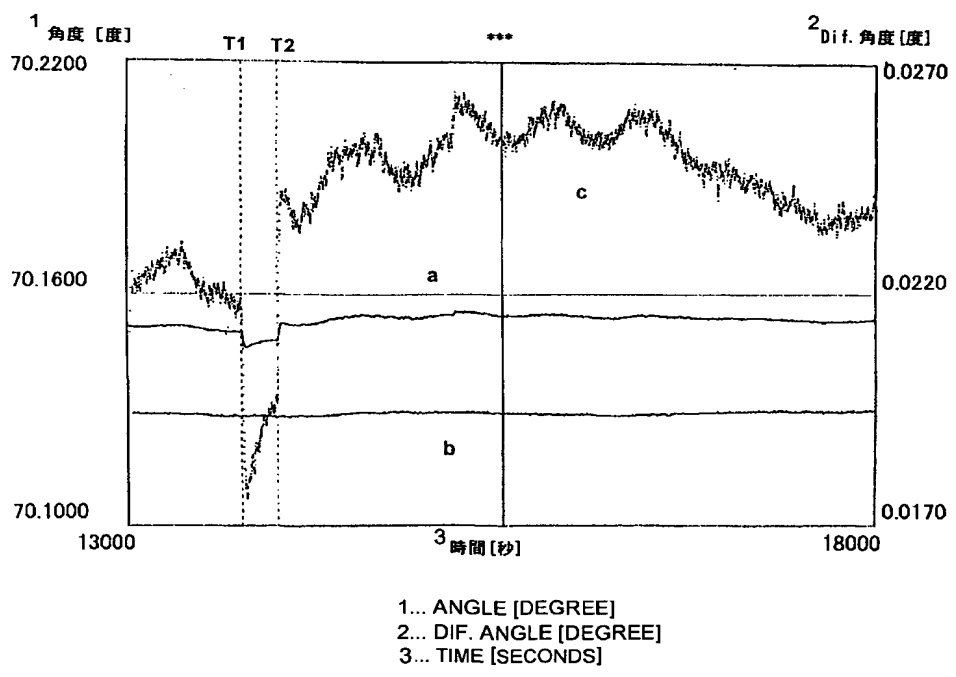
(10) 国際公開番号
WO 03/060514 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/483, 21/27 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11565 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉里 勝利
(22) 国際出願日: 2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001) (YOSHIZATO, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒739-0144 広島
(25) 国際出願の言語: 日本語 県 東広島市 八本松南 7-2 2-1 3 Hiroshima (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語 佐藤 玄 (SATO, Hajime) [JP/JP]; 〒739-2121 広島県
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術 東広島市 高屋町小谷 3 2 4 8-3 0 Hiroshima (JP).
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY 秀道広 (HIDE, Michihiro) [JP/JP]; 〒734-0037 広島県
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 広島市 南区霞 2-3-2 3 Hiroshima (JP). 筒井 智子
本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 日本レーザ電子 (TSUTSUI, Tomoko) [JP/JP]; 〒739-0132 広島県 東広
株式会社 (NIPPON LASER & ELECTRONICS LAB.) 島市 八本松町正力 2 0 0 1-2 Hiroshima (JP). 米田
[JP/JP]; 〒456-0032 愛知県 名古屋市 熱田区三本松 英克 (YONEDA, Hidekatsu) [JP/JP]; 〒456-0032 愛知
町 2 0-9 Aichi (JP). 株式会社ジェイ・エム・エス 県 名古屋市 熱田区三本松町 2 0-9 日本レーザ電
(JMS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒730-8652 広島県 広島市中 子株式会社内 Aichi (JP).
区加古町 1 2-1 7 Hiroshima (JP). (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042
東京都 渋谷区 宇田川町 3 7-1 0 麻仁ビル 6 階
Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): CA, US.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF EVALUATING CELL ACTIVITY

(54) 発明の名称: 細胞活性の評価方法



(57) Abstract: A method of evaluating the physiological activity of an external stimulus on vital cells with the use of a surface plasmon resonance device, characterized in that the physiological activity of the external stimulus on the cells is evaluated by using, as an indication, a second signal appearing after a first signal observed upon the exposure of the vital cells to the external stimulus. By using this method, the physiological activity level of an external stimulus on vital cells can be accurately evaluated.

[続葉有]

WO 03/060514 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

表面プラズモン共鳴装置を用いて生細胞に対する外部刺激の生理活性を評価する方法であって、生細胞が外部刺激に暴露された際に観察される1次シグナルの後に出現する2次シグナルを指標として、細胞に対する外部刺激の生理活性を評価することを特徴とする方法を提供する。この発明の方法によって、生細胞に対する外部刺激の生理活性の程度を正確に評価することが可能となる。

明細書

細胞活性の評価方法

5

技術分野

この出願の発明は、細胞活性の評価方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、表面プラズモン共鳴装置（SPR 装置）を用いて、生細胞に対する外部刺激の生理活性を評価する方法、または外部刺激に応答する生細胞を選別する方法に関するものであり、この方法は、例えば、薬剤や毒性物質の *in vitro* 検査等に利用することができる。

15

背景技術

リガンドの結合、温度や pH 等の環境変化、機械的あるいは電氣的刺激といった外部からの刺激が生細胞に与える影響を、細胞が生きたまま、かつリアルタイムで観測できれば、種々の活性物質や物理条件が細胞に与える影響をより正確に測定することが可能であり、臨床現場での迅速診断や治療戦略の確定に大きく貢献する。したがって、そのような細胞に対する生理活性を評価することを可能とする装置や診断システムの開発が望まれているが、現在のところ臨床検査等に利用可能な装置やシステムは存在していない。

例えば、マスト細胞を抗原刺激すると、まず高親和性 IgE 受容体が凝集し、数秒後にその α および β 鎖がリン酸化される。その変化により種々のキナーゼ蛋白の会合とリン酸化が起こり、チロシンキナーゼ、フォスホリパーゼ C、G 蛋白の活性化などの細胞内情報伝達に関わる酵素群が活性化され、数分～数十分後にかけて分泌顆粒の細胞膜への融合による化学伝達物質の放出が引き起こされる。また同時に転写因子の活性化が起こり、数時間～十数時間後には TNF α 、IL-4 などの起炎症性サイトカインが合成、遊離されることが知られている。

これまで細胞の脱顆粒の動態は、解析したい時間毎に反応系の上清を回収し、その中に含まれるヒスタミンやサイトカインなどの物質量を定量することにより測定していた。しかしながらこの方法では、測定のために少なくとも一部の反応上清を回収する必要がある、反応条件が変化するため測定と同時に反応を停止せざるを得ないのが現状であった。

さらに、細胞内カルシウム濃度の動態、pH 変化、特定の蛋白の細胞内移動などは、特異的蛍光色素プローブのロードや GFP タグ付き蛋白のトランスフェクションなどによる細胞修飾を行うことにより解析可能であるが、いずれも細胞に対して予め何らかの修飾が必要である。そのため少なくともそれらの修飾の分だけは細胞機能が影響を受ける可能性があり、原則としてそれらの検査に用いた細胞を再び生体に戻して利用することはできないといった問題を有していた。

一方、SPR (surface plasmon resonance) 装置は、表面プラズモン共鳴現象を応用し、共鳴角度変化をリアルタイムでとらえることにより、タンパク質等の生体分子間の反応・結合量の測定および速度論解析ができる装置である。この共鳴角度変化は、センサ部の金膜表面近傍における誘電率の変化に依存する。結合測定を行いたいタンパク質の片側をまず金膜上に固定する。タンパク質はそれぞれ固有の誘電率を持っている。SPR では金膜上に固定化されたタンパク質に対しリガンドとの結合測定を行う。ここでタンパク質とリガンドの結合が起こった場合は複合体が金膜上に形成され誘電率が変化する。つまり金属膜表面の誘電率をリアルタイムに追っていくことにより、生体分子間の反応結合量・結合速度定数・解離速度定数・解離定数・親和性定数等の情報を得ることができる。

また、タンパク質等の生体分子だけではなく、固定した生細胞に結合するリガンドの結合量・結合速度定数・解離速度定数・解離定数・親和性定数等を測定できる装置も開発されてもいる。

前記のとおり、生細胞を対象とすることのできる SPR 装置は、細胞が外部刺激に暴露されている際の誘電率変化を測定することが可能である。今回、この出願の発明者らは、外部刺激により引き起こされる細胞自体の反応も誘電率に変化を与えることを見出した。

この出願は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、生細胞に対する外部刺激の生理活性の程度を正確に評価することのできる新しい方法を提供することを課題としている。

5

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、表面プラズモン共鳴装置
10 を用いて生細胞に対する外部刺激の生理活性を評価する方法であって、生細胞が外部刺激に暴露された際に観察される 1 次シグナルの後に出現する 2 次シグナルを指標として、細胞に対する外部刺激の生理活性を評価することを特徴とする方法を提供する。

15 また、この発明方法においては、2 次シグナルとして、外部刺激が除去された後に出現するシグナルを測定することを好ましい態様としてもいる。

図面の簡単な説明

20

図 1 は、CTLL-2 細胞に対する IL-2 の作用を測定した結果である。a : IL-2、b : コントロール、c : a と b の差。T1-T2 間で IL-2 添加。T1-T2 間の反応が 1 次シグナル、T2 以降の反応が 2 次シグナル。

25 図 2 は、Papilla 細胞に対する bFGF の作用を測定した結果である。a : bFGF、b : bFGF+阻害剤、c : a と b の差。T1 時点で bFGF（および阻害剤）を添加。T1-T2 間の反応が 1 次シグナル、T2 以降の反応が 2 次シグナル。

図 3 は、mast cell に対する抗原作用を測定した結果である。a : IgE 未感作細胞に
30 DNP-HSA 刺激、b : IgE 感作細胞に DNP-HSA 刺激、c : a と b の差。T1 時点で DNP-HAS を添加。T1 以降の反応が 2 次シグナル。2 次シグナルが強く出現しているため、1 次シグナルは記録されていない。

図 4 は、mast cell に対する DNP-lysine の作用を測定した結果である。T1 時点で DNP-lysine を添加。T1-T2 間の反応が 1 次シグナル。

5

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明方法において、外部刺激とは、細胞表面の受容体に対するリガンド、温度や pH 等の環境変化、機械的あるいは電氣的刺激など、細胞の活性（例えば、
10 細胞内の情報伝達系の賦活等）に対して作用する全ての刺激を包含する。

この発明の方法においては、生細胞を対象とする通常の SPR 測定と同様にして、細胞を装置に固定し、前記の刺激を細胞に与え、通常の手続に従って誘電率変化のシグナルを測定するが、細胞が刺激されている期間のシグナル（1 次シグナル）だけ
15 だけではなく、1 次シグナルに引き続き出現する 2 次シグナルを指標として外部刺激の細胞活性を評価することを特徴としている。

例えば、SPR 装置内に固定した生細胞にリガンドが結合すると、その量に比例してベースラインが上昇し、安定化する（1 次シグナル）。リガンドが細胞に対して
20 生理活性を持つ場合、初期シグナルに続いて、単なる結合シグナルとは明らかに異なるベースラインの上昇あるいはベースラインの周期的な変動（2 次シグナル）が観測される。このような 2 次シグナルは生理活性が確認されているリガンドを添加したときにのみ現れることから、リガンドが生細胞へ結合することにより引き起こされる何らかの生体反応を反映していると考えられる。

25

このように、この発明の方法では、細胞に対する外部刺激の生理活性を正確に評価することが可能であるため、例えば、抗原刺激あるいはサイトカインや薬剤の投与等により患者本人の細胞に生じる変化をリアルタイムで追跡することができ、その解析結果を迅速に臨床現場へフィードバックさせることにより、治療効果の判定
30 や予測、治療方針の策定に利用できる。さらに具体的には、以下のような臨床診断に利用することができる。

- (1) 生体より採取した生細胞（血液、生検材料など）の迅速なアレルギー反応検査、人体を使った誘発試験。
- (2) 手術中に得られたガン細胞などの病変部細胞を細胞増殖因子等で刺激し、迅速
5 に機能検査や正常細胞か悪性細胞かの判定を行う。術中に結果が出せるため、そのデータを基に切除領域を決定できる。
- (3) 個人による異なる必要薬剤量の解析：現在、遺伝子変異解析(SNP)により個人毎の薬剤反応性の違いを検査し、いわゆるテーラーメイド医療の実現が目指されている。この発明の方法により、個人毎の末梢血細胞(リンパ球、好塩基球、好酸球、抗原提示細胞など)の薬剤反応性を解析することにより、個人毎に異なる薬剤の必要量の算定を行うことができる。
- (4) 薬剤アレルギーの診断：臨床治験によりほとんどのヒトに安全性が確認されている薬剤でも、稀に重篤なアレルギー反応を起こすことがある。しかしながら複数の薬剤を投与されている場合は原因薬剤を同定することは困難である。この発明の方法により、患者白血球の薬剤への反応性を解析することにより薬剤アレルギーの原因薬剤を同定することができる。
- (5) 体外受精させた受精卵の着床率はそれほど高いものではない。そこで、この発明の方法では、細胞を生きたまま扱えることから、着床率の高い受精卵を選別し子宮に戻すことも可能である。これによって体外授精の精度を高めることが出来ると同時に、人工授精を望む女性の精神的、肉体的負担を大きく軽減できる。
- (6) 細胞を何らかの物質または物理的条件の変化により刺激した際におこる反応（例えば、受容体分子および関連する細胞内情報伝達分子の凝集・会合、リン酸化、脱リン酸化、膜へのトランスロケーションなど細胞内転位等）を測定する。これらの情報は治療薬の選択、治療効果の判定に有用である。
- (7) 動物細胞等を培養する際、培地に加えられる血清はロット間でバラツキが大きく、このためにデータの再現性が失われることはしばしば経験するところである。血清存在下での細胞の反応を SPR でモニターする事により、血清のロット管理が迅速

速に行える。

実施例

5

以下、実施例を示してこの発明方法についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。なお、以下の実施例においては、SPR 装置は SPR-CELLIA（日本レーザー電子株式会社）を使用した。また、アミンカップリング用センサーチップの調整は以下のとおりに行った。

10

10 μ M 4,4-Dithiodibutyric acid エタノール溶液にセンサーチップを浸して 30 分間攪拌した。終了後、無水エタノールによる洗浄を行い、乾燥させた。25mg の水溶性カルボジイミドを 1ml のミリQ水に、15 mg の N-hydroxysuccinimide を 1,4-Dioxane 9ml にそれぞれ溶解し、この 2 つの溶液を直前に混合し、乾燥させたセンサーチップを浸して 10 分間攪拌した。ついで 10 ml のミリQ水を加えて 5 分間攪拌し、ミリQ水で洗浄した後、ミリQ水中で保存した。

実施例 1

20

CTLL-2 細胞（浮遊細胞）と IL-2 の反応

PBS に懸濁した CTLL-2 細胞 (2×10^5 cells/ml) 30 μ l ずつを活性化させたセンサーチップの測定部とコントロール部の両側に直接滴下し、1%BSA50 μ l で blocking した。センサーチップを SPR 装置に装着し、温度を 37°C に設定して PBS を 15 μ l/min の流速で流した。測定部側に 62.5 ng/ml の IL-2 を 60 μ l 注入し、そのまま PBS

結果は図 1 に示したとおりである。測定部とコントロール部から得られるシグナルの差をとると、約 10 分間程度の周期性を持つ特徴的なシグナルが見いだされた。これは生細胞においてのみ観測される。一方、IL-3、bFGF、aFGF、プレイオトロフィンなど、本来 CTLL-2 細胞とは結合しない試薬を添加したときにはシグナルは観測されなかった。このことは、生細胞がリガンドと結合したときに生じる何らかの現象を SPR が捉えていることを示す。

30

実施例 2

Papilla 細胞（間葉系細胞）と bFGF の反応

シャーレから 0.02% EDTA で papilla 細胞を剥がし、DMEM10 培地に懸濁させた。

- 5 2×10^5 cells/ml 400 μ l を実施例 1 と同様にしてセンサーチップに固定化した。

流速 15 μ l/min、設定温度 37°C で PBS を流し、コントロール部は 1 μ g/ml bFGF のみ、測定部には 1 μ g/ml bFGF + 50 μ M リン酸化阻害剤 (SU4984) 60 μ l を注入し、42 秒後に回路を閉じてシグナル変化を測定した。

- 10 結果は図 2 に示したとおりである。注入 10 分後から SU4984 を加えているほうのシグナルがプラトーになったのに対し、bFGF のみではシグナルは上昇しつづけた。これは、bFGF の結合によって引き起こされるシグナル伝達がリン酸化阻害剤によって抑えられたことを反映している。

15

実施例 3

mast cell（肥満細胞）の抗原に対する反応

- 20 mast cell (2×10^5 cells/ml 70 μ l) を実施例 1 と同様にしてセンサーチップに固定し、測定部に IgE を加え、CO₂ インキュベーター中で 37°C、一夜培養した。チップを SPR 装置に装着し、流速 15 μ l/min、設定温度 37°C でランニングバッファ (PIPES buffer、pH7.2) を流した。DNP-HSA (dinitrophenyl-human serum albumin) 100 ng/ml または DNP-lysine 10 μ g/ml を 60 μ l 注入し、そのままランニングバッファを流しつづけ、シグナル変化を測定した。なお、PIPES (Piperazine-N,N'-bis[2-ethane-sulfonic acid]; 1,4-Piperazine-diethanesulfonic acid) バッファの組成は表 1 の
- 25 とおりである。

表 1

NaCl	119(mM)
KCl	5
PIPES	25
Glucose	5.6
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.4
NaOH	40
CaCl ₂	1

結果は図 3 に示したとおりである。DNP-HSA を添加すると、IgE で感作している mast cell では特異的な抗原抗体反応による活性化を反映した強いシグナルが観測されるが、未感作の mast cell では特徴的な変化は認められなかった。また、IgE には結合するが細胞は活性化しない DNP-lysone を添加した場合には、DNP-lysine の結合に伴う 1 次シグナルは観察されたが、2 次シグナルは認められなかった（図 4）。これらの結果から、この発明方法により、細胞の活性化を迅速に測定可能であることが確認された。

10

産業上の利用可能性

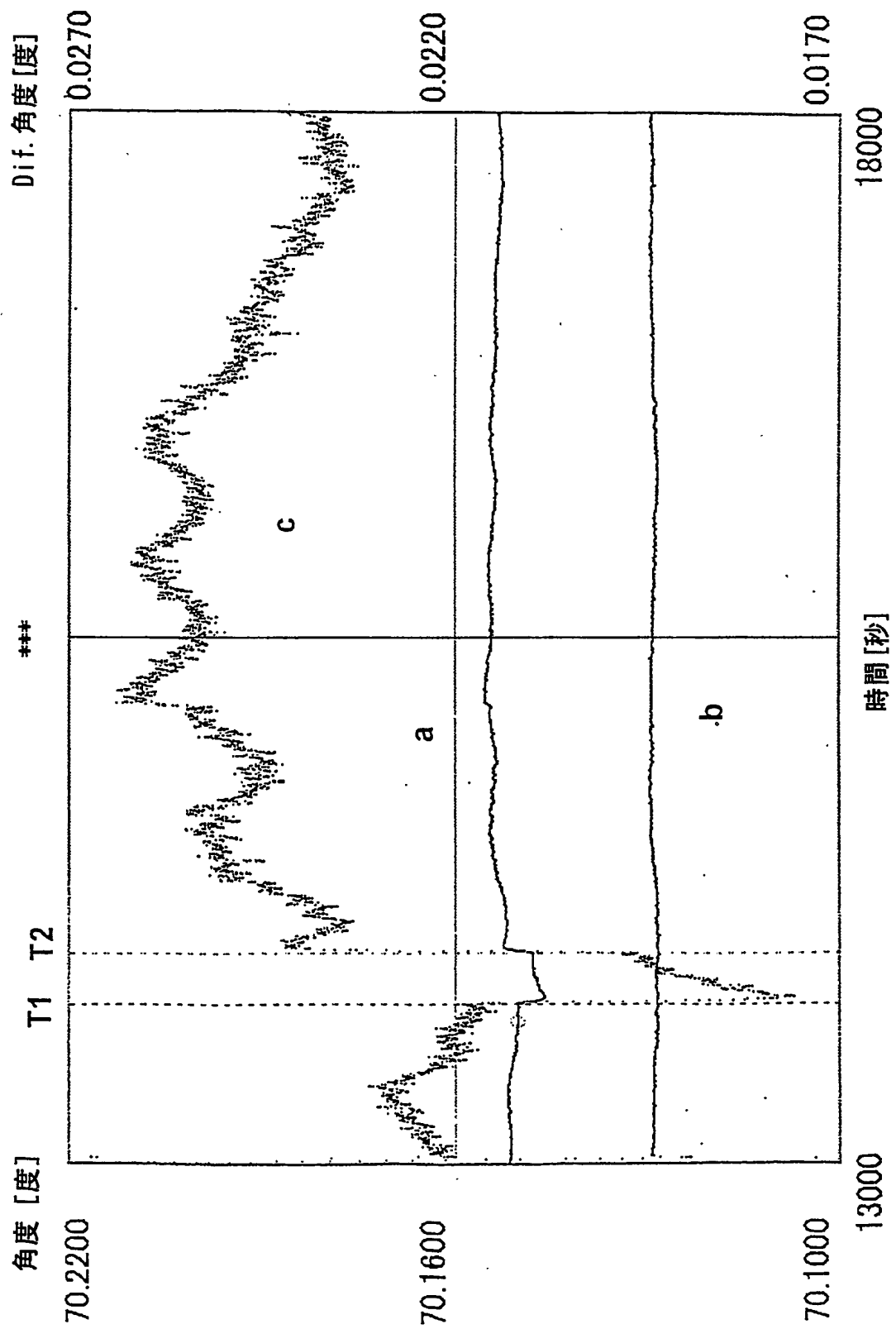
以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、外部刺激による細胞活性の有無や程度を簡便かつ正確に評価することが可能となる。これにより、例えば、患者本人から採取した細胞を生きたまま用い、この細胞に対する薬剤やアレルギー物質等の作用を判定できることから、臨床上有益な情報を得られる。また、診断に用いた細胞を患者に再移植できることから、体外受精のみならず、細胞移植や ex vivo タイプの遺伝子治療等への応用も可能となる。

請求の範囲

1. 表面プラズモン共鳴装置を用いて生細胞に対する外部刺激の生理活性を評価する方法であって、生細胞が外部刺激に暴露された際に観察される1次シグナルの後に出現する2次シグナルを指標として、細胞に対する外部刺激の生理活性を評価することを特徴とする方法。
- 5
2. 2次シグナルとして、外部刺激が除去された後に出現するシグナルを測定する請求項1の方法。

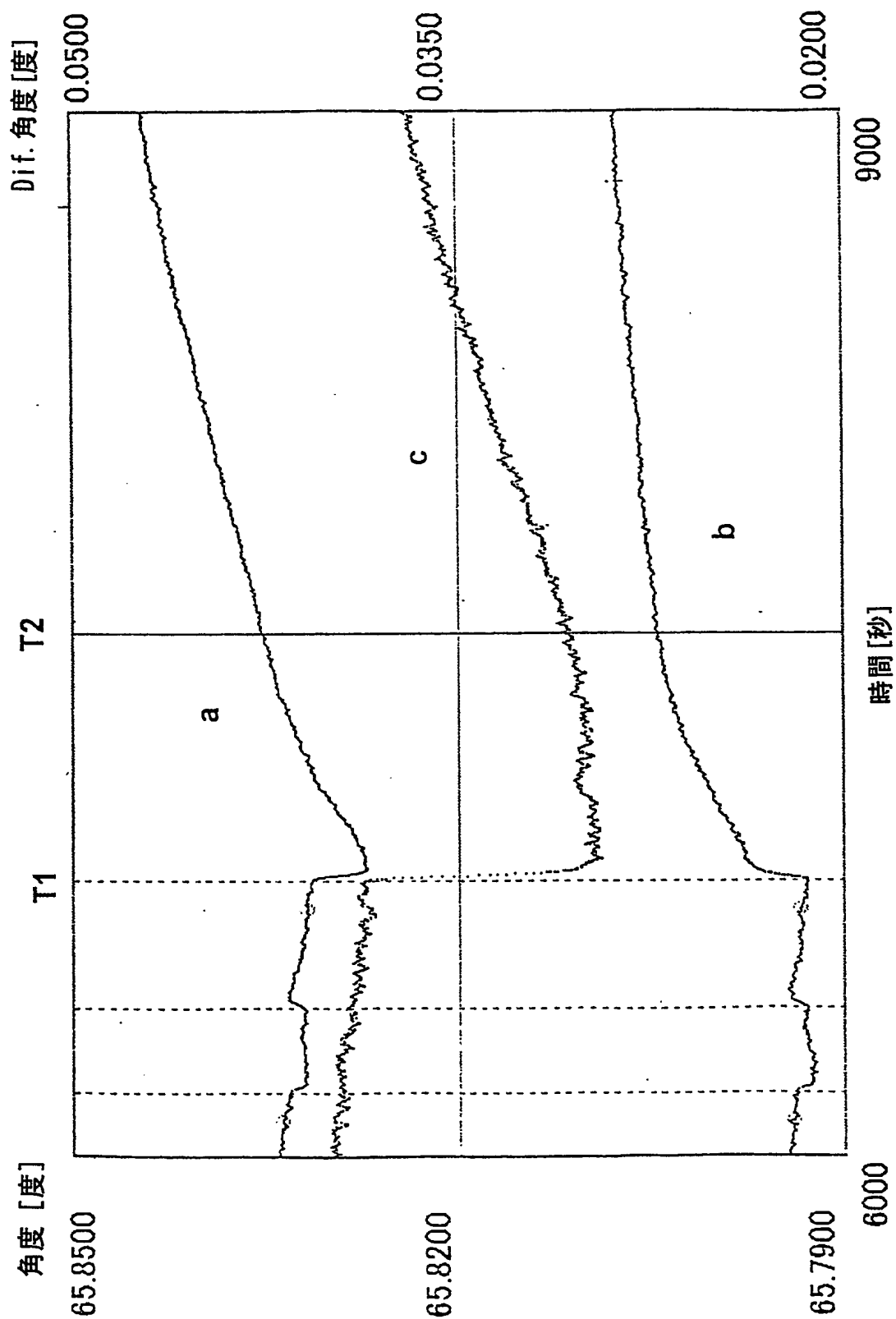
1/4

図 1



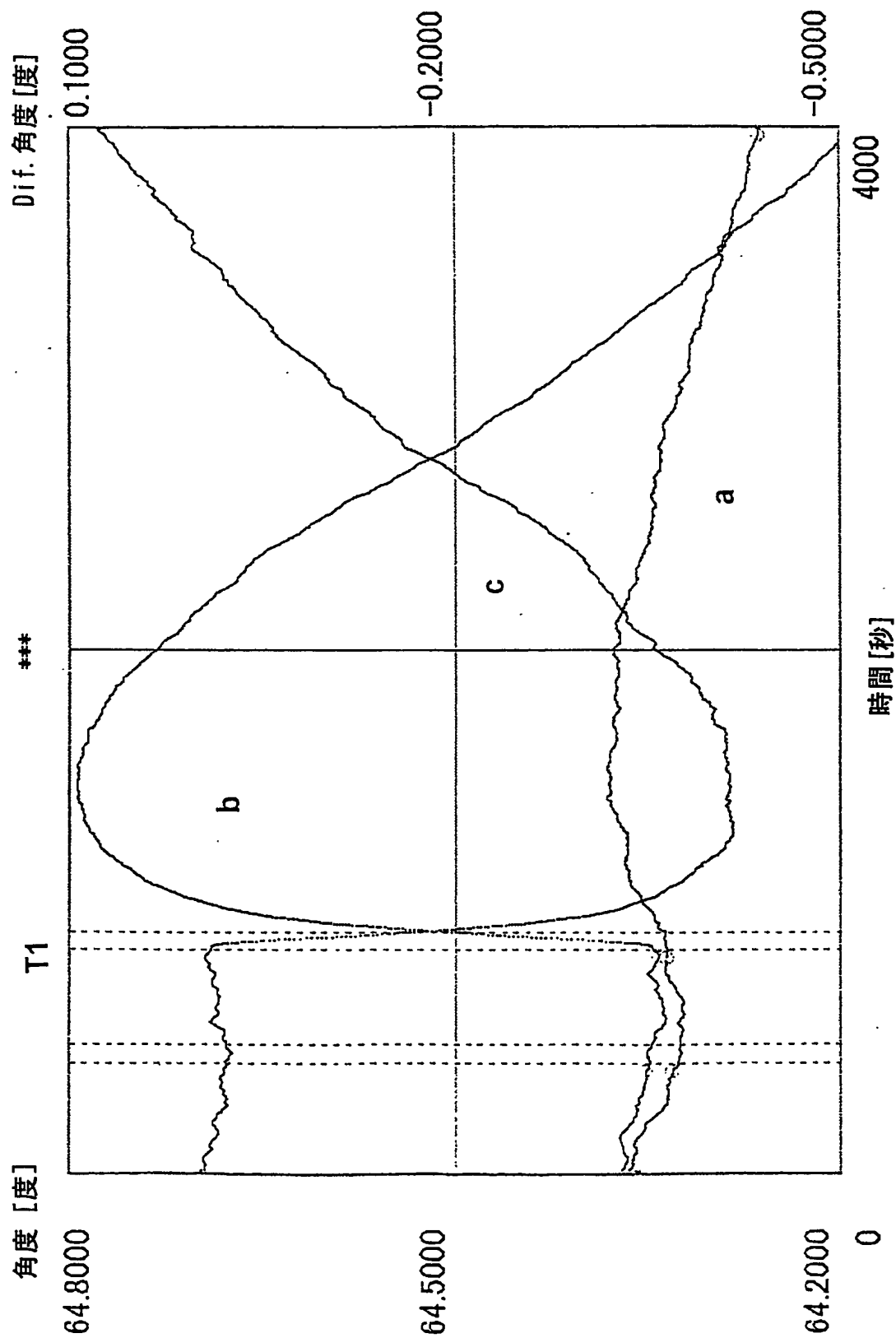
2/4

図 2



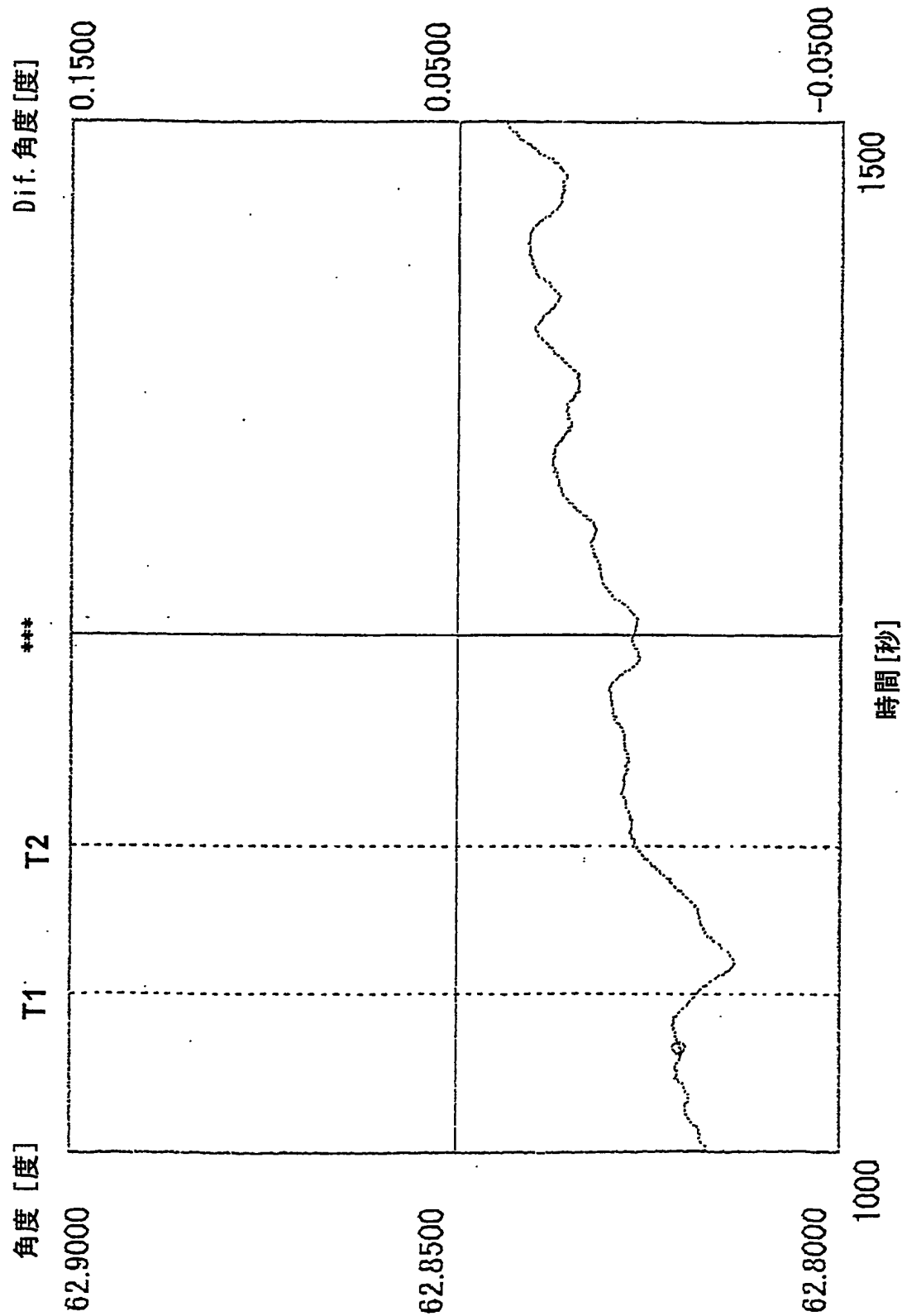
3/4

図 3



4/4

☒ 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/483, G01N21/27

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/483, G01N21/27

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-194298 A (Nippon Telegr. & Teleph. Corp. <NTT>), 19 July, 2001 (19.07.2001), working examples; Par. No. [0019] (Family: none)	1-2
A	JP 2001-255267 A (Kanagawa Academy of Science & Technology), 21 September, 2001 (21.09.2001), Claim 13; Par. No. [0031] (Family: none)	1-2
A	JP 2000-162124 A (Nippon Laser Denshi K.K.), 16 June, 2000 (16.06.2000) (Family: none)	1-2
A	JP 2001-208755 A (Pref. Of Fukuoka), 03 August, 2001 (03.08.2001), Claims; working examples (Family: none)	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 21 January, 2002 (21.01.02)

Date of mailing of the international search report
 29 January, 2002 (29.01.02)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/483, G01N21/27

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/483, G01N21/27

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-194298 A, (日本電信電話株式会社) 2001. 7. 19 実施 例、【0019】 (ファミリーなし)	1-2
A	JP 2001-255267 A, (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2001. 9. 21 請求項 13、【0031】 (ファミリーなし)	1-2
A	JP 2000-162124 A, (日本レーザ電子株式会社) 2000. 6. 16 (ファミリーなし)	1-2
A	JP 2001-208755 A, (福岡県) 2001. 8. 3 特許請求の範囲、実施 例 (ファミリーなし)	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 01. 02

国際調査報告の発送日

29.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J.P.)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3250